

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

19/37, DE/39 (Item 39 from file: 351)

U09497907 WPI Acc No: 93-191443/24

XRAM Acc No: C93-085076

Compsn. for treating c-erbB-2 producing tumours - comprises adriamycin bound to monoclonal antibody specific for peptide from hydrophobic extracellular region of c-erbB-2

Index Terms: COMPOSITION TREAT PRODUCE TUMOUR COMPRISE ADRIAMYCIN BOUND MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC PEPTIDE HYDROPHOBIC EXTRACELLULAR REGION

Patent Assignee: (IWAS) IWASAKI ELECTRIC CO LTD; (UEDA/) UEDA M

Number of Patents: 001

Number of Countries: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Week	Applic No	Date	LA	Pages	IPC
JP 5117165	A	930514	9324	JP 91303845	911024		7	0A61K-039/395 @ (B)

Priority Data (CC No Date): JP 91303845 (911024)

Abstract (Basic): JP 05117165 A

- (1) The anti-tumour agent contg. the antibody to adenocarcinoma membrane protein and the antibody binding anti-tumour agent, is new.
- (2) The anti-tumour agent in (1) of which antibody binding anti-tumour agent is anti-tumour antibiotic, is new. (3) The anti-tumour agent in (2) of which antibody binding anti-tumour agent is adriamycin, is new.
- (4) The anti-tumour agent in (1-4) of which the antibody is monoclonal antibody to the peptide of hydrophobic extracellular region of c-erbB-2

-2, is new. (5) The anti-tumour agent in (4) of which the antigen is the peptide (His-Thr-Ala-Asn-Arg- Pro-Glu-Asp-Glu-Cys-Val-Gly-Glu-Gly-Leu), is new.

USE/ADVANTAGE - The anti-tumour agent has stronger cytotoxic effect to c-erbB-2 producing tumour than using adriamycin only. The side effect of the new agent is decrease.

In an example, mice were immunised by the peptide (His-Thr-Ala-Asn-Arg- Pro-Glu-Asp-Glu-Cys-Val- Gly-Glu-Gly-Leu) as antigen. The immunised spleen cells and ASP2/0 were fused and the hybridoma was prep'd. The monoclonal antibody was prep'd. from the hybridoma. The monoclonal and SPDP were mixed at 30-150 : 1 and reacted at 30 deg.C for 30 mins. SPDP-monoclonal antibody and SPDP-adriamycin were reacted at 4 deg.C for 90 mins. in the soln. contg. 50mM triethylamine, 50mM NaCl, and 1mM ethylenediamine tetraacetate (pH8.0). The monoclonal antibody binding adriamycin was added to the adenocarcinoma (expressed c-erbB-2) cell culture. The cytotoxic activity of the anti-tumour agent was dependent on the expression amt. of c-erbB-2. The same IC50 as adriamycin use, was obtd. by 1/20 vol. use of the new agent. Dwg.0/1

Derwent Class: @B04@; @D16@;

Int Pat Class: -@A61K-031/71@; @A61K-039/395@; @A61K-045/00@; @C12N-005/18@; @C12P-021/08@

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-117165

(43)公開日 平成5年(1993)5月14日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 39/395	L	8413-4C		
31/71		8314-4C		
39/395	T	8413-4C		
	C	8413-4C		
		7236-4B	C 12 N 5/00	B
			審査請求 未請求 請求項の数5(全7頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号 特願平3-303845

(22)出願日 平成3年(1991)10月24日

(71)出願人 591143250

上田 政和

東京都新宿区南山伏町2-10

(71)出願人 000000192

岩崎電気株式会社

東京都港区芝3丁目12番4号

(72)発明者 上田 政和

東京都新宿区南山伏町2番10号 ニューハ

イツ市ケ谷504号室

(74)代理人 弁理士 戸田 親男

(54)【発明の名称】 抗癌剤

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 既存の抗癌剤、特に抗腫瘍性抗生物質を利用し、標的癌細胞に対して該抗癌剤を集中移行させることにより、副作用を広く軽減させ安全性と癌治療効果を向上せしめるシステムを提供する。

【構成】 癌遺伝子C-e r b B-2産物の蛋白質アミノ酸配列中の細胞外親水部位の部分ペプチドを抗原として得られたモノクローナル抗体を、腺癌細胞の膜蛋白質を認識する抗体として利用し、この抗体にアドレアマイシンを接合させることにより得られた抗体接合抗癌剤を有効成分とする抗癌剤。

【効果】 本抗癌剤は、腺癌細胞、特に癌遺伝子C-e r b B-2の産物を産生する癌細胞に効果的に作用する。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗体を接合する抗癌剤と、腺癌細胞の膜蛋白質を認識する抗体との接合体を有効成分とすることを特徴とする抗癌剤。

【請求項2】 抗体を接合する抗癌剤が抗腫瘍性抗生物質であることを特徴とする請求項1の抗癌剤。

【請求項3】 抗体を接合する抗癌剤がアドレアマイシンであることを特徴とする請求項2の抗癌剤。

【請求項4】 癌遺伝子c-erbB-2産物の蛋白質*



【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、抗癌剤に関するものであり、更に詳細には、腺癌細胞、特に癌遺伝子c-erbB-2の産物を産生する癌細胞に効果的な抗癌剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 アドレアマイシン (Adriamycin) が放線菌ストレプトミセス・ビューセチウス・バル・ケシウス (*Streptomyces peucetius var. caesius*) から生産される抗生物質であって、抗腫瘍作用を有することは既知であり（宮野成二ほか2名訳、「医薬品化学(II) - 臨床薬学と薬の構造活性相関」広川書店（昭55-9-20）p. 474-475）、腺癌の治療には、主としてこのアドレアマイシンが使用されている。

【0003】 しかしながら、アドレアマイシンに限らず従来用いられている抗癌剤は、一般的に副作用が強く、分裂、増殖の旺盛な正常細胞にも損傷を与える。そのため、投与量を制限せざるを得ず、したがって効果的な治療ができないのが現状である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的はすぐれた抗癌剤を開発することであるが、新規な抗腫瘍性物質を新たに開発するのではなく、既存の抗癌剤を利用しながらその副作用を広く軽減せしめるシステムを新たに開発することを目的とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明は、上記目的を達成するためになされたものであって、体内に投与された抗癌剤が特異的に癌細胞に集中移行すれば少量の抗癌剤でも有効な治療が可能となり、副作用の問題も軽減されるとの観点から、抗癌剤を癌細胞に対して特異的に集中せしめるシステムを開発することにより、上記目的を達成することとした。

【0006】 そこで各方面から検討の結果、腺癌、特に乳癌において過剰に発現している、癌遺伝子c-erbB-2の発現産物、すなわち細胞膜貫通性の蛋白質に着目し、この腺癌の細胞外親水部位を認識する抗体を作製し、これと抗癌剤との接合体 (conjugate) を

* アミノ酸配列中の細胞外親水部位の部分ペプチドを抗原として得られたモノクローナル抗体を、腺癌細胞の膜蛋白質を認識する抗体として用いることを特徴とする請求項1～請求項3のいずれか1項の抗癌剤。

【請求項5】 抗原が下記の化1で示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることを特徴とする請求項4の抗癌剤。

【化1】

作製したところ、癌細胞、特に腺癌細胞に対して非常に有効な抗癌剤であることが確認され、本発明の完成に至ったものである。

【0007】 すなわち本発明は、抗体を接合する抗癌剤と、腺癌細胞の膜蛋白質を認識する抗体との接合体を有効成分とする抗癌剤を、その基本的技術思想とするものである。

【0008】 本発明においては、腺癌細胞の膜蛋白質を認識する抗体を使用するが、それには膜蛋白質及び／又は部分ペプチドを抗原とし、必要あればキャリアー蛋白質と結合した後、これを抗原として常法にしたがって抗体を調製すればよい。

【0009】 上記のように抗原としては、該膜蛋白質及び／又はその部分ペプチドが広く使用できるが、例えば癌遺伝子c-erbB-2の発現産物も抗原として有利に使用できる。癌遺伝子c-erbB-2は、乳癌や胃癌といった腺癌組織において増幅されており、その産物には分子量185kDaの膜貫通性の蛋白質が含まれているので、これをそのまま又はその部分ペプチドを抗原として使用することができる。

【0010】 後者については、c-erbB-2産物の蛋白質アミノ酸配列の中で、細胞外の部分に相当する親水性部位のペプチド（アミノ酸残基数約10～20）を合成し、得られた親水性ペプチドを（キャリアー蛋白質に結合させて）抗原とし、常法にしたがって処理すればポリクローナル抗体を得ることができる。このポリクローナル抗体も、後記するところからも明らかのように、癌細胞を特異的に認識することができるので、各種抗癌剤と接合せしめることによって本発明に係るすぐれた抗癌剤を製造するのに利用することができる。また、更に抗体の特異性を高めて更に有効な抗癌剤を製造するため、上記抗原を用いて常法にしたがってモノクローナル抗体を調製し、これを各種抗癌剤と接合せしめて、目的とする抗癌剤を製造することも可能である。

【0011】 抗原ペプチドとしては、例えば後記する参考例において示すペプチドの内、5のペプチドが最も有利に使用できるが、これのみに限定されるものではなく、1～4のペプチドも有利に使用することができる。

【0012】 このような抗原から得た抗体は、各種の抗癌剤と接合せしめて目的とする接合抗癌剤を製造するの

20

30

40

50

50

であるが、接合方法は、ジアゾ法、ペプチド法、アルキル化法、架橋法等の共有結合法のほかイオン結合法、その他既知の接合方法がすべて利用できる。

【0013】本発明にしたがって腺癌細胞の膜蛋白質を認識する抗体と接合せしめる抗癌剤としては、アドレアマイシンやその類縁体であるダウノルビシン等抗生物質系抗癌剤のほかすべてのタイプの抗癌剤が使用でき、その非限定的例としては次のものが挙げられる：アクチノマイシンC、同D、アドレアマイシン、カルチノスタチン、カルチノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、マイトイシン、ネオカルチノスタチン、ミスラマイシン、ブレオマイシン、ストレブトマイシンその他。

【0014】

【作用】本発明の制癌システムの作用機序の詳細については今後の研究にまたねばならないが、現時点では次のように推定される。すなわち、本発明において使用する抗体は、癌細胞の細胞内ではなく膜を貫通して細胞外に出た遺伝子産物部位を認識するものであるため、特異性が極めて高く癌細胞を正確且つ迅速に認識することができるという特性を有するものである。したがって、本発明に係る接合体は、まずははじめに抗体部分が迅速に癌細胞を識別し、次いで癌細胞上に存在する抗原（細胞外部に貫通した遺伝子産物部位）と複合体を形成し、そしてその複合体が細胞内に陷入し、それと同時に抗体と接合しているアドレアマイシン等の抗癌剤も細胞内に侵入し、この侵入した抗癌剤が癌細胞の増殖を阻害するものと推定される。

【0015】本発明に係る薬剤組成物は、抗体を接合する抗癌剤と抗体との接合体を有効成分としてこれに常用される無機又は有機の担体を加えて、固体、半固体又は液体の形で、経口投与剤のほか、外用剤等の非経口投与剤に製剤化する。

【0016】経口投与のための製剤としては、錠剤、丸剤、顆粒剤、軟・伸カプセル剤、散剤、細粒剤、粉剤、乳濁剤、懸濁剤、シロップ剤、ペレット剤、エリキシル

等が挙げられる。非経口投与のための製剤としては、注射剤、点滴剤、輸液、軟膏、ローション、トニック、スプレー、懸濁剤、油剤、乳剤、坐剤等が挙げられる。本発明の有効成分を製剤化するには、常法にしたがえばよく、界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張剤その他常用される佐薬を適宜使用する。

【0017】本発明に係る薬剤組成物の投与量は、その種類、治療ないし予防対象癌の種類、投与方法、患者の年令、患者の症状、処理時間等によって相違するが、静脈投与の場合は成人ひとり当たり1日に有効成分（本物質）を0.01～1000mg/kg、好ましくは0.1～100mg/kg投与する。

【0018】本発明において使用する抗体は、これをマウスに対して投与した場合、少なくとも100mg/kgマウスまでは、体重及び寿命のいずれにおいても変化は認められなかった。また、アドレアマイシンについては、その投与量は、一般に成人の場合、40mgを8回投与し、最大投与の許容量は500mgであり、マウスの場合は500μgが最大許容量であり、したがって本発明に係る接合体の急性毒性はこれらの値以上ということとなり、本接合体は非常に安全性が高いものである。以下、本発明を参考例及び実施例により更に詳しく述べる。

【0019】

【参考例1】c-erbB-2癌遺伝子によってコードされた産物の親水性部位をChou-Fasmanの方法を用いて検索し、それらのいくつかについて、その合成ペプチドを作成し、キャリアー蛋白質に結合し、それを抗原としてマウスを免疫した。得られた抗血清について、c-erbB-2の発現が認識されている乳癌細胞株SK-BR-IIIに対する反応性を、細胞を固相化したELISA法で調べ、下記表1で示される第1表の結果を得た。

【0020】

【表1】

第1表 親水性部位のペプチドと反応性

	免疫ペプチド	N端残基	反応性
1	His-Asn-Gln-Glu-Val-Thr-Ala-Glu-Asp-Gly-Thr-Gln-Arg-Cys-Glu-Lys	318~333	++
2	Thr-Leu-Ile-Asp-Thr-Asn-Arg-Ser-Arg-Ala	182~191	++
3	Leu-Arg-Ser-Leu-Arg-Glu-Leu-Gly-Leu-Ala	455~466	+
4	Tyr-Met-Pro-Ile-Trp-Lys-Phe-Pro-Asp-Glu-Glu-Gly-Ala	610~622	+
5	His-Thr-Ala-Asn-Arg-Pro-Glu-Asp-Glu-Cys-Val-Gly-Glu-Gly-Lue	495~509	+++++

【0021】上記結果から明らかなように、c-erb B-2癌遺伝子産物の蛋白質アミノ酸配列中の細胞外親水部位の部分ペプチドは、いずれも、すぐれた抗原であり、第1表5のペプチドが最も好ましいが他のペプチドも好適であることが確認された。

【0022】

【実施例1】c-erb B-2癌遺伝子によってコードされた産物のN端495から509までの残基のペプチド（上記第1表5の合成ペプチド）を抗原とし、それにより免疫したマウス脾細胞と、マウス骨髄腫細胞（SP2/0）を細胞融合させ、ハイブリドーマを作製することにより、モノクローナル抗体が得られる。作製手順の概要は以下である。

【0023】抗原ペプチドは、アミノ酸配列がHTANRPEDECVGEGLである合成ペプチドと、キャリア蛋白質として、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）をグルタルアルデヒドを用いて架橋させて作製した。作製の方法は、G. Walter等の方法（Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 6197, 1980）に準じた。次に、免疫は、上記を抗原としBalb/cマウスを用いた。また、細胞融合は、Behzadian, M. A. 等の方法（Cell Struct. Funct., 10, 219, 1985）に準じて行なった。スクリーニングはELISA法を用いた。

【0024】得られたモノクローナル抗体はヒトc-erb B-2産物を認識する。なお、このモノクローナル抗体が、c-erb B-2産物に対するものであるか否

かは、c-erb B-2の発現が確認されている乳癌細胞株SK-BR-IIIの蛋白質を³⁵S-methionineで放射標識したもの可溶化し免疫沈澱を行ない、SDS電気泳動法で展開後、そのオートラジオグラフィーを分析することにより、確認された。

【0025】

【1. モノクローナル抗体の製造】

【0026】

【（1）抗原蛋白質の調製】前記ペプチドの合成は、自動ペプチド合成装置による固相法で行なった。さらに、1mg KLHと3mgペプチドを0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.2）中で、2.5%グルタルアルデヒドで架橋反応を行なった。さらに、フリーのグルタルアルデヒドを除くために、0.01Mリン酸緩衝液（pH 7.4）+0.15M NaCl中で透析を行なった。

【0027】

【（2）免疫】100μg抗原蛋白質とフロイント不完全アジュバントを、Balb/cマウスの皮下に14日間隔で3回投与した。ペプチドに対する抗血清が得られているか否かは、ペプチドを96穴プレートに固定しELISA法で調べた。この時、抗マウスIgGに酵素POXを接合したものを用いた。基質としてはOPDである。

【0028】

【（3）細胞融合】免疫されたBalb/cマウスの脾臓を摘出し、RPMI 1640培地中で脾細胞を押し出す。マウス骨髄腫細胞SP2/0を脾細胞数の1/5～1/10倍加え、RPMIを遠心で除いた後、ポリエ

7

チレングリコール（分子量4000、シグマ）で細胞融合を行なった。ポリエチレングリコールの排除、融合の確実性を得るために、直ちに遠心を行ない、HAT培地にて培養した。約一週間後血清培地にて限界希釈法にてクローニングを行なった。スクリーニングはELISA法にて行なった。

【0029】

【(4) モノクローナル抗体の調製】得られたハイブリドーマを、15% FCS、グルタミン酸、インシュリンを含んだRPMI 1640培地で増殖し、X線処理、ブリストン投与したBa 1b/cマウスの腹腔内に細胞（10⁷/四）を投与する。約3週間後、腹水を取り遠心分離を行ない、上清からDEAEセルロースカラムを用いて抗体を精製した。

【0030】

【II. c-erbB-2産物に対するモノクローナル抗体の性質】

【0031】

【(1) 抗体のサブクラスの同定】Ouchterlony法に準じて行なった。抗マウスIgM又は抗マウスIgGと、得られたモノクローナル抗体を1%寒天中で反応させ、沈降線を生ずるか否かで調べた結果、モノクローナル抗体はIgMと確認された。

【0032】

【(2) 分子量】セファクリルS-300superfineを用いてカラムクロマトグラフィーで調べた。

【0033】

【(3) 抗体の免疫特性】³⁵S-methionineで蛋白質を放射標識したSK-BR-III細胞を可溶化し、それにモノクローナル抗体を加え反応させ、遠心による沈澱物の数回の洗浄後、SDS電気泳動（7.5%）で展開し、そのゲルのオートラジオグラフィーを取ったところ、185kDa付近に一本のバンドが観察された。この分子量はヒトc-erbB-2産物と同じであり、この抗体がc-erbB-2産物を認識していることは明らかである。

【0034】

【実施例2】

【0035】

【(1) アドレアマイシンの調整】メタノール又はジメチルスルホキシド(DMSO)液中で、アドレアマイシンと3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-スクシニミジル(SPDP)を等モル比で混合し、3~6

8

時間反応させて、アドレアマイシンを修飾した。

【0036】

【(2) アドレアマイシンと抗体との接合体の調製】実施例1で調製したモノクローナル抗体とSPDPとをモル比で30~150:1の割合で混合し、30℃で30分間反応させた。ここでSPDPの最終濃度は5~10mMになるように調整し、未反応のSPDPはPD-1カラムで除いた。

【0037】このようにしてSPDPで修飾したモノクローナル抗体と上記第(1)項で得たSPDP修飾アドレアマイシンとを、pH8.0の50mMトリエチルアミン、50mM塩化ナトリウム、1mMエチレンジアミンテトラ酢酸液中で、4℃で90分間反応させた。未反応のSPDPあるいはアドレアマイシンはPD-1カラムで除去し、接合体を得た。

【0038】

【実施例3】実施例2で調製したアドレアマイシンと抗体との接合体の殺細胞効果を次の方法で確認した。本例で用いた細胞は、次の3種類の乳腺癌細胞であって、SK-BR-III、BT-474、MCF-7、この順序で細胞の癌遺伝子c-erbB-2の発現量も少なくなっていた。

【0039】

【(1) 方法】殺細胞効果は、除菌した本接合体及びアドレアマイシンを、対数増殖期にある供試細胞の培養液中に投与し、投与後72時間して生存細胞数を計測して判定評価した。

【0040】細胞増殖抑制率は、上記によって測定した生存細胞数から、細胞増殖抑制率=(C₀-C₁)/C₀×100の式にしたがって算出した。上式において、C₀は供試癌細胞に生理食塩水を投与したときの生存細胞数、C₁は前記計測生存細胞数をそれぞれ示す。

【0041】

【(2) 結果】SK-BR-IIIに対するアドレアマイシン濃度と細胞増殖抑制率との関係を示すと図1のとおりであった。図中、aは本接合体、bはアドレアマイシン単独投与(対照)を表わす。

【0042】また供試癌細胞において、抗癌剤の50%細胞増殖抑制率を示す抗癌剤濃度IC₅₀を求めた結果、下記する表2の結果が得られた。

【0043】

【表2】

癌細胞の種類	I C ₅₀ (10 ⁻⁶ M)		b/a
	a	b	
SK-BR-III	1.3	30	23
BT-474	1.8	>100	>56
MCF-7	2.5	2.5	1

(但し表中、a：本接合体、b：アドレアマイシン単独、
 b/a：aに対するbのI C₅₀値の割合を示す。
 なお、BT-474において、10⁻⁷ M以下のアド
 レアマイシンの投与濃度では殺細胞効果は確認されな
 かった。)

【0044】

【(3) 結論】上記結果から明らかなように、本実施例で用いた抗癌剤a、bの殺細胞効果は、癌遺伝子c-e r b B-2の発現量に依存しており、この作用機序はその発現産物を介したものであることを示唆している。

【0045】またb/aの項から、本発明に係る接合体は、SK-BR-III細胞では、アドレアマイシン単独投与に比べて約20分の1の少量で同等のI C₅₀値が得られることが理解される。このことは、本発明に係る接合体がアドレアマイシン単独に比べて約20倍の殺細胞効果を示すものである。

【0046】更に、BT-474細胞で、アドレアマイシン単独投与では10⁻⁷ M以下の濃度では殺細胞効果は確*30

*認められないが、本発明に係る接合体では充分な効果を示した。このことは、アドレアマイシン単独投与で効果を示さなくとも、本発明にしたがって接合体にすることによって充分に効果が期待できる場合があることを示唆するものである。

【0047】

【実施例4 注射剤の製造】下記の表3に示す(1)～(4)の全成分を蒸留水1000mlに溶解した後、アンプルに1mlずつ分注して、注射剤100本を製造した。

【0048】

【表3】

注射剤の处方

(1) 実施例2で製造した接合体	5 g
(2) 食 塩	9 g
(3) クロロブタノール	5 g
(4) 炭酸水素ナトリウム	1 g

【0049】

【発明の効果】本発明は、以上述べたように、癌遺伝子c-e r b B-2の産物を產生する癌細胞に対して、アドレアマイシン等抗癌剤単独よりも非常に有効な殺細胞効果を示し、副作用を軽減した安全にして効果の高い新しい抗癌剤を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

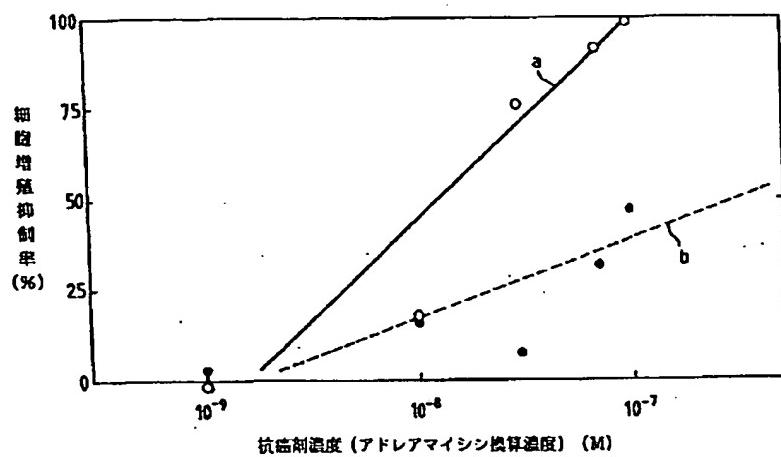
【図1】乳癌細胞SK-BR-IIIにおける細胞増殖抑制率と抗癌剤濃度との関係を示したグラフである。

【符号の説明】

a：本発明に係る接合体

b：アドレアマイシン単独投与（対照）

【図1】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
 A 6 1 K 45/00 ADU 8415-4C
 C 1 2 N 5/18
 C 1 2 P 21/08 8214-4B